

TOXOCARA

CE



Western Blot IgG

In vitro dijagnostički imunoblot test
Poluautomatizirana/ručna metoda

#TXA-WB24G: 24 tests

#TXA-WB12G: 12 tests

#TXA-WB96G: 96 tests

UPUTE ZA UPOTREBU

Poiščite več informacij in navodila za uporabo v svojem jeziku na naši spletni strani

www.ldbiodiagnostics.com

Namjena

TOXOCARA Western Blot (WB) IgG je jednokratna upotreba kvalitativan test serološke dijagnostike IgG pomoću imunoblot testa za toksokariaze namijenjenog za potvrdno ispitivanje pozitivnog ili dvosmislenog rezultata dobivenog klasičnim testovima probira. Uzorak može biti serum, cerebrospinalna tekućina (CST) ili tekući humour.

Princip testa

Western Blot tehnika

Izlučujući / sekretorni (ES) antigeni *Toxocara canis*, jednom odvojeni elektroforezom, vezani su elektroblotom na površinu nitrocelulozne membrane (koja se naziva prijenos) izrezana na 24 trake označene brojevima od 1 do 24.

Provođenje ispitivanja

Svaki uzorak koji se ispituje odvojeno je inkubiran s trakom. Specifična antitijela koja su potencijalno prisutna u uzorku selektivno se vežu na antigene. Alkalna fosfataza-anti-ljudski IgG konjugat se zatim veže na vezana antitijela. Konačno, imunokompleksi reagiraju s supstratom. Antigeni koje prepoznaju specifična antitijela tipa IgG prisutna u uzorcima se prikazuju kao ljubičaste transverzalne trake.

Reagensi uključeni u kit

Zadana vrijednost: paket od 24 testova (#TXA-WB24G)

italic: pakiranje od 12 testova (#TXA-WB12G) - **bold**: pakiranje od 96 testova (#TXA-WB96G).

ID	Kol.	Opis	Sastav
R1	1	Mape od 24 (12, 4x24) STRIPOVI: standardni + obojani standardi. (Svaka mapa i svaki prijenos identificira se jedinstvenim serijskim brojem).	Senzitizirana nitroceluloza. Molekularna težina u boji (kDa): Plava: 250, Plava: 150, Plava: 100, Ružičasta: 75, Plava: 50, Zelena: 37, Ružičasta: 25, Plava: 20, Plava: 15.
R2	1	Bočica od 30 (30, 125) ml PUFERA ZA UZORAK (spremna za upotrebu - ružičasta otopina).	Pufer + surfaktant.
R3	1	Bočica (e) od 30 (30, 2x60) ml ANTI IgG KONJUGAT (spremna za upotrebu - plava otopina).	Pufer + anti-humani IgG poliklonalni kozji serum konjugiran s alkalnom fosfatazom + NaN ₃ (<0.1%) + stabilizatori.
R5	1	Bočica od 30 (30, 125) ml SUBSTRATA (Spreman za upotrebu - neprozirna smeđa bočica).	Pufer + NBT + BCIP + stabilizatori.
R6	1	Bočica od 60 (60, 250) ml WASH CONCENTRATE 10X PUFER (Razrijediti 10 puta u destiliranoj vodi - bezbojna otopina).	Pufer + surfaktant.
R10	1	Epruveta od 100 (100, 2x100) µl POZITIVNOG KONTROLNOG SERUMA (Spreman za uporabu - crvena kapa).	Pufer + bazen humanog seruma pozitivan u <i>Toxocara</i> serologiji + NaN ₃ (<0,1%) + stabilizatori.

R1: La letra que precede a cada número de banda es específica del parámetro.

R2, R3, R5 i R6 zajednički su za sve kitove LDBIO Diagnostics i imaju jedinstveni serijski broj koji ovisi samo o datumu njihove proizvodnje. **Preporučuje se provođenje višeparametarskog ispitivanja (vidi LDBIO Diagnostics raspon imunoblotova) kako bi se ograničio broj otvorenih bočica i kako bi se osigurala bolja kontrola kvalitete.**

R10 je kalibriran prema referentnoj seriji te je namijenjen samo ovoj tehnici.

R3, R10 (NaN₃): EUH 032 - U dodiru s kiselinama oslobađa vrlo otrovni plin.

EUH 210 Sigurnosno-tehnički list dostupan na zahtjev i na našoj web stranici www.ldbiodiagnostics.com.

Potrebni dodatni material koji nije uključen

- Višekanalne polipropilenske inkubacijske posude za mini-mrlje (# WBPP-08 ili ekvivalent).
- Platforma za ljuhanje za imunoblokove, vakuumski sustav za tekućine (kade # WBPP-08 koje isporučujemo mogu se isprazniti jednostavnim okretanjem).
- Cijevi i materijal za crtanje uzoraka, stupnjeviti cilindri, prilagođeni spremnici.
- Automatske pipete, mikropipete i vrhovi za jednokratnu uporabu (volumeni od 10, 25 µl, 1,2 ml i 2 ml).
- Destilirana ili deionizirana voda. Upijajući papir (npr. Whatman filter papir), prozirna ljepljiva traka.
- Rukavice, pincete za rukovanje trakama, rezačem ili skalpelom, ravnim transparentnim ravnilom.

Napomena: Naši reagensi mogu se koristiti u automatiziranom imunoblot procesoru. **Treba paziti na moguće kemijske kontaminacije naših reagensa ako se procesor dijeli s reagensima drugog proizvođača** (poznati primjer: kontaminacija TWEEN-om 20) i bakterijske kontaminacije. Rezervirajte bočice za procesor. Nakon obrade ne stavljajte preostale korištene reagense natrag u originalne bočice.

Skladištenje i stabilnost

Skladištiti između 2 i 8°C. Reagensi iz kita stabilni su do isteka roka valjanosti naznačenog na vanjskoj kutiji i naljepnicama bočice. Ne koristite kontaminirani ili mutni reagens. Pufer za ispiranje razrijeđen do 1/10 stabilan je 2 mjeseca na +2 do +8°C i jedan tjedan na sobnoj temperaturi.

Mjere opreza prilikom upotrebe

Sigurnost

- Samo za *in vitro* uporabu. Samo za profesionalnu upotrebu. Samo za tehnički osposobljeno osoblje. Rukovati u skladu s dobrom laboratorijskom praksom i smatrati svaki reagens i bilo koji uzorak potencijalno toksičnim i / ili zaraznim.
- Nosite laboratorijsku odjeću, rukavice i naočale; nemojte piti, jesti ili pušiti u laboratoriju. Ne stavljajte pipete u usta.
- Pozitivna kontrola je serum ljudskog podrijetla koji je inaktiviran za viruse HIV 1 i 2, hepatitis B i hepatitis C. Njime se mora rukovati kao s potencijalno zaraznim proizvodom.
- Supstrat sadrži mješavinu NBT-a i BCIP-a, toksičnog za kontakt (koža i sluznice) i inhalacija.
- Reagensi sadrže natrijev azid koji može tvoriti eksplozivne metalne soli s olovom i bakrom. Isprati prosuto vodom.
- Odložite otpad (uzorke, vrhove, epruvete, tekućinu za pranje, korišteni reagens ...) u skladu s dobrom praksom u industriji i važećim propisima u zemlji.
- Svaki ozbiljni incident mora biti predmet prijave proizvođača i nadležnog tijela.

Mjere opreza

- Očitajte i protumačite rezultate pod izravnim bijelim svjetlom.
- Poželjno je koristiti sve reagense iz iste serije. Ako se koriste različite serije, osigurati sljedivost.
- Koristite trake u brojčanom redoslijedu. Nemojte miješati trake s različitim serijskim brojevima; koristiti prijenose uzastopce. Uspostavite poseban plan distribucije prije početka ispitivanja.
- Nemojte dodirivati trake prstima; koristite pincete.
- Reagensi se prije uporabe moraju dobro izmiješati, osobito koncentrirani pufer za ispiranje.
- Nakon upotrebe zatvorite bočice; nemojte koristiti ako je tvar slučajno uvedena u reagense. Ne koristite reagens iz bočice koja pokazuje znakove curenja. Nemojte koristiti mutnu ili istaloženu otopinu.
- Koristite samo vrhove pipeta za jednokratnu uporabu. Izbjegavajte kontaminaciju među kanalima. Pazite na stvaranje pjene ili mjehurića u vrhovima pipeta (bakterijska kontaminacija bočica s reagensima).
- Inkubacijske posude čistite samo destiliranom vodom (nikada nemojte koristiti deterdžent ili izbjeljivač).
- Izostavljanje uzorka ili raspodjela neadekvatne količine može dovesti do negativnog ili pozitivnog rezultata testa, bez obzira na njegov stvarni status.

Uzorkovanje

Aseptički skupite uzorke u suhe epruvete. Potrebno je najmanje 10 µl seruma, tekućeg humour ili CSF-a. U slučaju tekućeg humour ili CSF, korištenje 25 µl će povećati osjetljivost testa.

Skladištite uzorke na 2-8°C dok se ne obrade. Ako moraju biti skladišteni duže od tjedan dana, potrebno je smrznuti uzorke na -20 ± 5 °C. Nemojte koristiti kontaminirani uzorak. Izbjegavajte zamrzavanje i odmrzavanje uzoraka više puta.

Iako nije zabilježena posebna križna reakcija s hemoliziranim, ikteričnim ili lipidnim serumima, preporuča se pažljivo interpretirati rezultate korištenja takvih uzoraka.

Priprema reagensa

Pufer za ispiranje: Za 4 testa, u čistoj bočici, razrijedite 10 ml koncentrata za pranje 10X (R6) u 90 ml destilirane ili deionizirane vode. Pazite da dobro promiješate razrijeđeni pufer.

Postupak

Napomena: Preporučuje se provođenje višeparametarskog ispitivanja (vidi LDBIO Diagnostics raspon imunoblotova) kako bi se ograničio broj otvorenih bočica i kako bi se osigurala bolja kontrola kvalitete.

1. Pripremite plan raspodjele uzoraka i C + pozitivnu kontrolu (R10).

Samo uporabom ove kontrole može se tehnički potvrditi ispitivanje i utvrditi za dani serijski broj, razvijene specifične trake. C + traka se ne može koristiti za interpretaciju rezultata traka iz mrlje drugog serijskog broja.

2. Izrežite potreban broj traka (R1) pomoću skalpela i čistog i suhog ravnog prozirnog ravnala, držeći plavu crtu za pozicioniranje na trakama: držite trake čvrsto na mjestu s ravnilom i izrežite ih na strani naprezanja (brojevi su vidljivi kroz ravnalo).
3. Ispipetirajte 1,2 ml uzorka pufera (R2) u svakom kanalu prema utvrđenom planu.
4. U brojčanom redoslijedu položite numerirane trake u kanale: pustite da se trake rehidriraju na površini pufera približno 2 minute s brojem vidljivim na vrhu, a ZATIM lagano protresite pladanj da biste ga u potpunosti uronili.
5. Podijelite uzorke i pozitivnu (e) kontrolu (e): prema planu distribucije, brzinom od 10 µl po kanalu (po mogućnosti 25 µl za tekući humour ili CSF). Nježno protresite posudu nakon svakog doziranja. Stavite podložak na platformu za ljuhanje. **Inkubirajte 90 min ± 5 min na 20-26°C.**
6. Korak ispiranja: Ispraznite sadržaj kanala pomoću Pasteurove pipete ili okrećite ladicu za inkubaciju. U svaki kanal dodajte 2 do 3 ml razrijeđenog pufera za ispiranje. Inkubirajte na platformi za ljuhanje 3 minute. Ponovite 2 puta, a zatim ispraznite sadržaj kanala. Osigurajte da se trake ne okreću tijekom ovih koraka.
7. Ispipetirajte 1,2 ml anti-IgG konjugata (R3) u svaki kanal. Postavite pliticu na platformu za ljuhanje. **Inkubirajte 60 min ± 5 min na 20-26°C**
8. Korak ispiranja: ponoviti korak 6
9. Ispipetirajte 1,2 ml NBT / BCIP supstrata (R5) u svaki od kanala. Stavite na platformu za ljuhanje i zaštitite je od izravnog svjetla. **Inkubirajte 60 min ± 5 min na 20-26°C**

Bez obzira na parametar, pratite razvoj boje. Razvoj se može zaustaviti ako boja pozadine trake potamni do točke gdje je čitanje teško (kvaliteta koraka ispiranja ima temeljni utjecaj na boju pozadine). Imajte na umu da će se trake osvijetljivati dok se suše.

10. Zaustavite reakciju ispiranjem supstrata s Pasteurovom pipetom ili okretanjem inkubacijske posude i ispuštanjem 2 ml destilirane vode u kanale. Ponovite ovaj zadnji korak pranja još jednom.
11. Sušenje trakica: Dok su kanali još uvijek napunjeni vodom, pomoću pinceta izvadite trake na numeriranom kraju i pohranite ih, s vidljivim brojem na Whatmanov upijajući papir. Neka se osuši na zraku. Boja traka prirodno će se olakšati tijekom sušenja. Tumačenje se mora obaviti samo nakon završetka sušenja.
12. Skladištenje: Trake prenesite na list papira koji će se koristiti za njihovo arhiviranje. Poravnajte linije pozicioniranja. Držeći ih na mjestu s ravnalom zalijepite vrh traka transparentnom ljepljivom trakom.

Za dobru interpretaciju trake moraju biti poredane po prijenosu i numeričkim redoslijedom, razmaknute u razmaku od najviše nekoliko milimetara. Nije pouzdano uspoređivati trake koje su udaljene jedna od druge (npr. Br.2 s br. 15). **Opasno je** (lažni rezultati) usporediti trake od različitih kompleta (trake s različitim serijskim brojevima).

Kontrola kvalitete i interpretacija

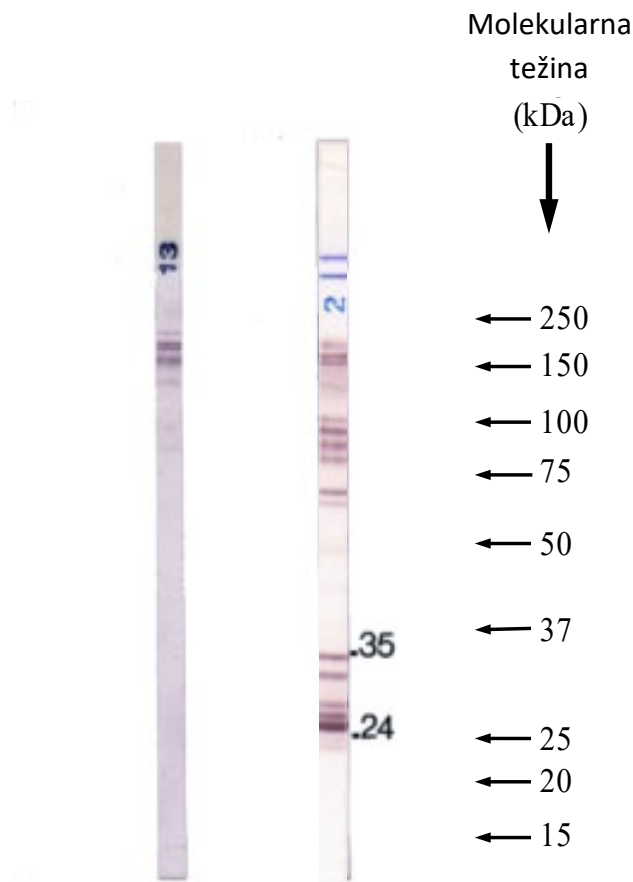
Kontrola seruma (R10) iz kita se mora sustavno uključiti u bilo koju seriju imunoblotova. Prikazuje tipičan profil i omogućuje: (1) tehničku validaciju dobrog vođenja testa (trake moraju biti vrlo jasno prikazane na traci); i (2) precizno kalibrirati položaj i aspekt specifičnih traka kako bi se omogućilo tumačenje rezultata traka od isti prijenos (isti serijski broj).

Nota Bene: Profil pozitivne kontrole (R10) može se razlikovati ovisno o broju serije korištenih reagensa. Odgovarajuće slike dostupne su na našoj web stranici www.ldbiodiagnostics.com kao primjer.

Opis traka

Pozitivni uzorak može predstavljati brojne trake između 15 i 200 kilodaltona (kDa). Potražite trake s niskom molekularnom težinom od 24-35 kDa (LMW) za svaki od testiranih uzoraka pomoću gore opisanih alata za identifikaciju. Ovi trakovi, grupirani i dobro izolirani, karakteristični su i općenito lako pronađeni.

Dvije skupine vrpce visoke molekularne težine (HMW) mogu se promatrati u rasponu 70-90 kDa i 100-200 kDa. Ovi bendovi nisu specifični za toksokariazu: moguća križna reakcija s drugim helmintom.



Slika 1: Primjer pozitivnih i negativnih rezultata

Profili su dati kao primjeri. Trake su označene slovom "B" specifičnim za parametar iz serije "01009".

Interpretacija

Istovremena prisutnost 2 trake između 24 i 35 kDa ukazuje na prisutnost protutijela specifičnih za *Toxocara*.

Da bi se potvrdili rezultati, uvijek usporedite profil imunoblot-a svakog uzorka s profilom pozitivne kontrole R10. Aspekt bendova je važan pri tumačenju testa.

Ograničenja

- Dijagnoza zarazne bolesti se ne može utvrditi na temelju jednog rezultata testa.
- Serološki rezultati se moraju tumačiti u skladu s dostupnim informacijama kako bi se uspostavila dijagnoza (npr. epidemiologija, klinička slika, slika, biologija itd.). Ne smiju se koristiti za postavljanje dijagnoze samo na temelju njihove pozitivnosti.

Izvedba (vidi reference iz literature)

Toxocara WB IgG test bio je predmetom usporedne studije s referentnim imunoblotom iz Toulouse CHU (University Hospital Center). Kriteriji tumačenja i uspješnost dvaju testova vrlo su usporedivi.

Osjetljivost

Podaci iz literature opisuju izvrsnu osjetljivost testa *Toxocara* WB IgG, često značajno viši od testa ES ELISA testa, potvrđujući mjesto imunoblota kao dijagnostičku i potvrđnu tehniku.

Napomena: Brojčana vrijednost osjetljivosti ne može se izračunati zbog nepostojanja referentne dijagnostičke metode.

Specifičnost

Specifičnost 24-35 traka od ES antigena je 100%. Trake izvan tog raspona ne smatraju se specifičnim.

Reproducibilnost

Ispitana je inter-serijska i inter-lot reproduktivnost. U oba slučaja, korelacija seruma i seruma s obzirom na specifične vrpce je odlična.

Interferencije

Iako nije zabilježena posebna križna reakcija s hemoliziranim, ikteričnim ili lipidnim serumima, preporuča se pažljivo interpretirati rezultate korištenja takvih uzoraka.

Rješavanje problema

"Trake su blijede s malo kontrasta": *Određeni serumi s niskim koncentracijama antitijela mogu dati takve rezultate.*

"Vide se zasjenjena područja, više ili manje obojena, malo difuzna": *Traka nije potpuno potopljena u jedan od reagensa i nije se pravilno inkubirala duž cijele dužine. Mrlje mogu također biti prisutne tamo gdje je uzorak bio odložen, ako se pladanj nije protresao nakon točenja.*

"Pozadinska buka je značajna, što otežava čitanje": *Ispiranje je bilo nedovoljno ili je posljednja inkubacija bila predugačka. Osigurati dobre tehnike ispitivanja, poštivati vrijeme ispiranja i osigurati kvalitetu vode. Smanjiti vrijeme posljednje inkubacije.*

Iznimno, određeni serumi mogu reagirati na nespecifičan način. Tada se rezultat imunoblota ne može koristiti. Ova nespecifična pozadinska buka može uključivati samo dio trake, što rezultate čini nerazumljivim samo za taj dio.

"U posljednjem stupnju razvoja pojavljuje se talog u otopini": supstrat može u stvari djelomično precipitirati (crne pahuljice) u puferu na kraju razvoja. Ovaj fenomen ne mijenja kvalitetu razvoja koji se mora normalno nastaviti. Posljednje ispiranje destiliranom vodom eliminira moguće krute čestice.

Literatura

- C. N. L. Macpherson, « The epidemiology and public health importance of toxocariasis: A zoonosis of global importance », *Int. J. Parasitol.*, vol. 43, n° 12-13, p. 999-1008, nov. 2013.
- J. F. Magnaval, R. Fabre, P. Maurières, J. P. Charlet, et B. de Larrard, « Application of the western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis », *Parasitol. Res.*, vol. 77, n° 8, p. 697-702, 1991.
- J. Fillaux et J.-F. Magnaval, « Laboratory diagnosis of human toxocariasis », *Vet. Parasitol.*, vol. 193, n° 4, p. 327-336, avr. 2013.
- B. Gavignet, R. Piarroux, F. Aubin, L. Millon, et P. Humbert, « Cutaneous manifestations of human toxocariasis », *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 59, n° 6, p. 1031-1042, déc. 2008.
- A. Nicoletti, V. Sofia, A. Mantella, G. Vitale, D. Contrafatto, V. Sorbello, R. Biondi, P.-M. Preux, H. H. Garcia, M. Zappia, et A. Bartoloni, « Epilepsy and toxocariasis: a case-control study in Italy », *Epilepsia*, vol. 49, n° 4, p. 594-599, avr. 2008.
- M. Zibaei, F. Firoozeh, P. Bahrami, et S. M. Sadjadi, « Investigation of Anti-Toxocara Antibodies in Epileptic Patients and Comparison of Two Methods: ELISA and Western Blotting », *Epilepsy Res. Treat.*, vol. 2013, p. 1-5, 2013.
- E. Artinyan, H. K. Uysal, O. Akgul, S. Altiparmak, et Y. A. Oner, « Research on Toxocara canis antibodies obtained from patients with eosinophilia », *Indian J. Med. Microbiol.*, vol. 32, n° 4, p. 383-386, déc. 2014.
- C. Incorvaia, Qualizza, Grande, et L. Allegra, « Seroprevalence of IgG anti-Toxocara species antibodies in a population of patients with suspected allergy », *Int. J. Gen. Med.*, p. 783, nov. 2011.
- J. Logar, B. Šoba, A. Kraut, et B. Stirn-Kranjc, « Seroprevalence of Toxocara antibodies among patients suspected of ocular toxocariasis in Slovenia », *Korean J. Parasitol.*, vol. 42, n° 3, p. 137, 2004.

obavijest o ažuriranju - pažljivo pročitajte

DATUM IZDANJA	VERZIJA	SAŽETAK IZMJEN
28/07/2021	Vs 14	Uklanjanje sigurnosnog upozorenja R5 - Kontakt adresa e-pošte – NaN3 EUH 032.
30/11/2022	Vs15	Nova adresa
21/12/2022	Vs16	R6 bez NaN3. Traka označena slovom B. Moguća uporaba reagensa iz različitih serija.



NF EN ISO 13485

24 Av. Joannes MASSET – 69009 LYON – FRANCE
 Tel : +33(0)4 7883 3487 – Fax : +33(0)4 7883 3430
www.ldbiodiagnostics.com – info@ldbiodiag.com